

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. med. H. J. Dengler

Prof. Dr. med. H. A. Kühn

Prof. Dr. med. H. G. Lasch

Untersuchungen zur Protein-Synthese
der Leber bei der
Anit- und Ikterogenin-Cholestase der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Erich Winter

Neuohlsch

Gießen

— 1969 —

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. med. H. J. Dengler

Prof. Dr. med. H. A. Kühn

Prof. Dr. med. H. G. Lasch

Untersuchungen zur Protein-Synthese
der Leber bei der
Anit- und Ikterogenin-Cholestase der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Erich Winter
Neuohlsch

Gießen

— 1969 —



Dekan: Prof.Dr.med. H. Rettig

Referent: Prof.Dr.med. H.A. Kühn

Korreferent: Prof.Dr.med. L. Rōka

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 1969

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung	1
II. Material	4
III. Methoden	5
IV. Ergebnisse	9
A Methodische Untersuchungen	9
B Einfluß von Bilirubin	13
C ANIT-Cholestase	15
D Ikterogenin-Intoxikation	31
V. Diskussion	37
VI. Zusammenfassung	41
VII. Literatur	42
Lebenslauf	46

I. EINLEITUNG

Bei dem Krankheitsbild der akuten Hepatitis beim Menschen ist es nicht bekannt, welche Stoffwechselveränderungen sich in der Leberzelle selbst abspielen. Geht man von der begründeten Vorstellung aus, daß die akute Hepatitis durch einen Virusinfekt hervorgerufen wird, so ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß durch den Virusbefall vor allem Änderungen des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels zu erwarten sind. So konnte kürzlich gezeigt werden, daß in Leberpunktionszylindern von Patienten mit akuter Hepatitis die Protein-Synthese gegenüber einem normalen Kontrollkollektiv erheblich gesteigert ist (16,17). Die Frage, ob diese erhöhte Protein-Synthese spezifisch nur durch den Virusinfekt hervorgerufen wird, läßt sich nur dann beantworten, wenn man sich davon überzeugt, daß die gleichen Veränderungen bei Lebererkrankungen anderer Genese nicht vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob sich eine erhöhte Protein-Synthese auch in der durch Cholestase veränderten Rattenleber findet; wobei eine vorwiegend intrahepatische Cholestase durch intraperitoneale Applikation von Taurolithocholsäure und Ikterogenin und ein vorwiegend mechanisch bedingter Verschlaußikterus durch Verfütterung von ANIT erzeugt wurde. Dabei wurde die experimentelle Cholestase an der Rattenleber noch aus folgendem Grund zur Untersuchung herangezogen:

Geht man von dem morphologischen Bild der akuten Hepatitis aus, wie es sich bei der lichtmikroskopischen Betrachtung zeigt, so sind neben den für die Virushepatitis typischen Veränderungen oft die histologischen Äquivalente einer intrahepatischen Cholestase zu erkennen. Es muß also versucht werden abzugrenzen, welche biochemischen Änderungen durch die Zeichen der Hepatitis oder welche Änderungen allein bereits durch das Vorliegen einer Cholestase bedingt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nukleinsäure und Protein-Synthese durch Einbau der beiden ^{14}C -markierten Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure in die entsprechenden Zellfraktionen gemessen. Als Kontrollsynthese diente der Einbau von ^{14}C -Nikotinsäure in die Nukleotide NSAD und NAD, zusätzlich wurde der Einbau von ^{14}C -Azetat in das nicht veresterte Cholesterin gemessen, da

bekannt ist, daß bei Vorliegen einer intra- oder extrahepatischen Cholestase die Cholesterin-Synthese in der Rattenleber gesteigert ist (10).

Die Untersuchungen wurden an Rattenleberschnitten in vitro durchgeführt.

Ein Teil der Untersuchungen wurde gemeinsam mit M. Schneider (19) vorgenommen.

* Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen sind auf Seite 3 erläutert.

Erläuterungen der in der vorliegenden Arbeit verwandten
Abkürzungen:

ANIT	alpha-naphthyl-iso-thiocyanat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Desintegrations per minute
EK	Endkonzentration
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinucleotid
NSAD	Nikotinsäure-adenin-dinucleotid
RNS	Ribonukleinsäure
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SLAP	Serum-Leucin-Amino-Peptidase
UPM	Umdrehungen pro Minute

II. MATERIAL

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Albinoratten vom Stamm Sprague-Dawley, mit einem Gewicht von 200 - 250 g, von der Süddeutschen Versuchstierfarm, Tuttlingen, bezogen.

2. ANIT (alpha-naphthyl-iso-thiocyanat) wurde von der EGA-Chemie KG, Steinheim, bezogen.

3. Ikterogenin wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. R. P. Enslin, National Chemical Research Laboratory, Pretoria, Union of South Africa, zur Verfügung gestellt.

4. Bilirubin wurde als Präparat Homburg 868/I von der Firma Homburg AG, Frankfurt, bezogen.

5. Die verwandten radioaktiven Substanzen

14-C-L-Asparaginsäure (U) (spez.Aktivität 8,8 mC/mMol)

14-C-Glycin (U) (spez.Aktivität 15,2 mC/mMol)

14-C-2-Na-azetat (spez.Aktivität 38 mC/mMol)

14-C-7-Nikotinsäure (spez.Aktivität 27,9 mC/mMol)

wurden von der Firma Buchler & Co, Braunschweig, bezogen.

6. Die Substanzen zur Bestimmung von Serumwerten

wurden als Testsätze der Firma C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, verwandt:

Bilirubin	Testsatz Nr.	15944	TBAA
SGPT	Testsatz Nr.	15856	TGAK
Cholesterin	Testsatz Nr.	15949	TCAA
SLAP	Testsatz Nr.	15952	TLAP

7. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase

erfolgte mit dem kinetischen Test der Firma Merck AG, Darmstadt:

Merckotest

Nr. 3314

8. Die Scintillatorsubstanzen wurden von der Firma Packard, Frankfurt, bezogen.

III. METHODEN

1. Herstellen der Leberschnitten

Die Versuchstiere wurden mit Äthyläther narkotisiert. Durch Herzpunktion konnte etwa 8 ml Blut gewonnen werden. Nach Töten der Tiere wurde die herausgenommene Leber in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gebracht. Mit einer Rasierklinge wurden hauchdünne Leberschnitten geschnitten und insgesamt 50 mg $\pm$ 10 mg Lebergewebe in Inkubationsgläschen eingewogen. Danach wurden 2,0 ml des eiskalten Inkubationsgemisches einpipettiert. Die Gläschen wurden mit Carbogen begast und unter Schütteln (Warburg) bei 37 Grad Celsius inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurden die Leberschnitten in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend bis zur Weiterbehandlung bei minus 18 Grad Celsius eingefroren.

2. Der Inkubationsansatz enthielt

1,3 μ C	14-C-L-Asparaginsäure (U)	(EK 5,75 mal 10^{-4} M)
1,3 μ C	14-C-2-Na-azetat	(EK 1,0 mal 10^{-3} M)
1,3 μ C	14-C-Glycin (U)	(EK 5,4 mal 10^{-4} M)
0,67 μ C	14-C-7-Nikotinsäure	(EK 1,5 mal 10^{-5} M)
	Glukose	(EK 5 mal 10^{-3} M)

in 2,0 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, pH 7,4.

3. Radioaktivitätsmessung

Als Scintillatormischung wurde ein Thix-Gel-Scintillator, bestehend aus

1800 ml Dioxan - 200 ml Äthanol - 252 g Naphthalin - 115 g Cab-O-Sil - 14 g 2,5-Diphenyloxazol - 360 mg 1,4-bis-2-C4-Methyl-5-Phenoxyloxazolyl-Benzol,

verwandt.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tri-Carb-Liquid-Scintillation-Counter, Modell Nr. 3375 (Firma Packard, Frankfurt/M).

Die Quenchkorrektur erfolgte mit Hilfe des externen Standards.

4. Tierversuche

a) ANIT (alpha-naphthyl-iso-thiocyanat)

Den Versuchstieren wurden 100 mg ANIT pro kg Körpergewicht, gelöst in Olivenöl - per Schlundsonde - gegeben.

Nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die Leber - wie oben beschrieben - weiterverarbeitet.

Die Kontrolltiere erhielten reines Olivenöl.

b) Ikterogenin

30 mg Ikterogenin wurden in 0,4 ml Äthanol gelöst, mit Aqua dest. ad 5,0 ml aufgefüllt und den Tieren 100 mg Ikterogenin pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Nach 24 Stunden und nach 48 Stunden wurden die Tierlebern - wie oben beschrieben - weiterverarbeitet.

Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel intraperitoneal.

c) Bilirubin

Dem Inkubationsansatz wurde 0 - 0,5 mg Bilirubin pro ml Ansatz zugefügt. Leberschnitten von unbehandelten Tieren wurden mit diesem Inkubationsgemisch 60 Minuten lang inkubiert.

5. Cholesterin-Synthese

Als Maß für die Cholesterin-Synthese wurde der Einbau von ^{14}C -Azetat in die digitoninfällbaren Lipide gewertet (20).

Auf das tiefgefrorene Lebergewebe wurde 0,2 ml Methanol gegeben und homogenisiert. Dazu wurden weitere 0,2 ml Methanol und 0,8 ml Chloroform gegeben. Nach 10 Minuten Stehenlassen bei 0 Grad Celsius, wurde 10 Minuten bei 5000 UPM zentrifugiert (Laborzentrifuge "Fixette" der Firma Christ) und der Rückstand für weitere Untersuchungen aufgehoben. Der Überstand wurde quantitativ in neue Zentrifugengläschen gebracht und mit 0,024 N Perchlorsäure einmal gewaschen, um wasserlösliche Substanzen zu entfernen. Die so gewonnene Gesamt-Lipid-Fraktion wurde mit Äthanol ad 4,0 ml aufgefüllt. Zu 2,0 ml wurden dann 1 mg Cholesterin (gelöst in 96 % Äthanol) und 4,0 ml Digitonin-Lösung (0,5 % in 50 % Äthanol) gegeben, die Gläser verschlossen und über Nacht stehengelassen. Danach wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde einmal mit Azeton-Äther (1:3) und einmal mit Äther gewaschen. Auf den trockenen Niederschlag wurde 1,0 ml Eisessig gegeben und aufgelöst. Zu 0,4 ml dieser Lösung wurden 15,0 ml Thix-Gel-Scintillator in einem Tri-Carb-Scintillations-Gläs-

chen zugesetzt und die Radioaktivität, wie vorher beschrieben, gemessen.

6. NAD-Synthese

Als Maß für die NAD-Synthese wurde der Einbau von ^{14}C -Nikotinsäure in die azetonfällbaren Nukleotide NSAD und NAD gewertet (8, 24)

Fraktion I

Der Leberückstand aus der Lipid-Fraktion wurde mit 1,0 ml eiskalter Perchlorsäure (0,6 N) aufgeschwemmt und 10 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Nach 10 Minuten zentrifugieren wurde der klare Überstand in andere Zentrifugengläser gegeben und der Rückstand aufbewahrt. Dem Überstand wurden 0,1 ml eines ATP-NAD-Gemisches (20 mg ATP, 20 mg NAD pro ml Aqua dest.) und 8,0 ml Azeton (minus 18 Grad Celsius) zugesetzt. Mit einem Glasstab wurde an der Innenwand der Zentrifugengläser so lange gerieben bis eine sichtbare Fällung auftrat. Die Gläser wurden 12 Stunden bei minus 18 Grad Celsius aufbewahrt. Nach Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde einmal mit Azeton und einmal mit Äther gewaschen. Der trockene Niederschlag wurde in 0,5 ml Aqua dest. gelöst. Von dieser Lösung wurden 0,4 ml, zusammen mit 10 ml Thix-Gel-Scintillator, in ein Zählgläschen gegeben.

Fraktion II

Die aus dem Lipidextrakt gewonnenen wasserlöslichen Nukleotide wurden wie Fraktion I behandelt.

Bei der Aufstellung der Endergebnisse wurden die Werte von Fraktion I und Fraktion II zusammengefaßt.

7. Nukleinsäure-Synthese

Als Maß für die Nukleinsäure-Synthese wurde der Einbau von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Asparaginsäure in die bei 80 Grad Celsius durch Perchlorsäure extrahierbaren Nukleinsäuren gewertet. Der Rückstand aus der NAD-Fraktion I-Aufarbeitung wurde mit eiskalter Perchlorsäure (0,6 N) gewaschen und anschließend die Nukleinsäuren mit 1,5 ml Perchlorsäure (0,6 N) eine Stunde bei 80 Grad Celsius extrahiert. 0,2 ml des Extraktes wurden zusammen mit 15,0 ml Thix-Gel-Scintillator in ein Zählgläschen gegeben.

8. Protein-Synthese

Als Maß für die Proteinsäure wurde der Einbau von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Asparaginsäure in die Perchlorsäure unlösliche Fraktion gewertet.

Der Rückstand nach Extraktion der Nukleinsäuren wurde mit Äthanol und Äther je einmal gewaschen und getrocknet und dann in 0,5 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst. 0,4 ml der Lösung wurden zusammen mit 10,0 ml Thix-Gel-Scintillator in Zählgläsern gegeben.

9. Serumbestimmungen

Das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde 60 Minuten bei 4 Grad Celsius gekühlt, 10 Minuten bei 1500 UPM zentrifugiert und das Serum abgehoben.

Bestimmt wurden die SGPT, SLAP und AP als kinetische Tests, das Gesamtbilirubin und Gesamt-Cholesterin als Farbtests mittels Testsätzen.

Für die Messungen wurde ein Photometer der Firma Eppendorf benutzt.

10. Signifikanzberechnung

Die Signifikanzen wurden nach dem t-Test berechnet.

11. Histologische Untersuchungen

Das Anfertigen und Färben der histologischen Präparate erfolgte im histologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik Gießen.

Für die Beurteilung der Präparate sind wir Herrn Dr. med. B. Leinweber zu großem Dank verpflichtet.

IV. ERGEBNISSE

A Methodische Untersuchungen

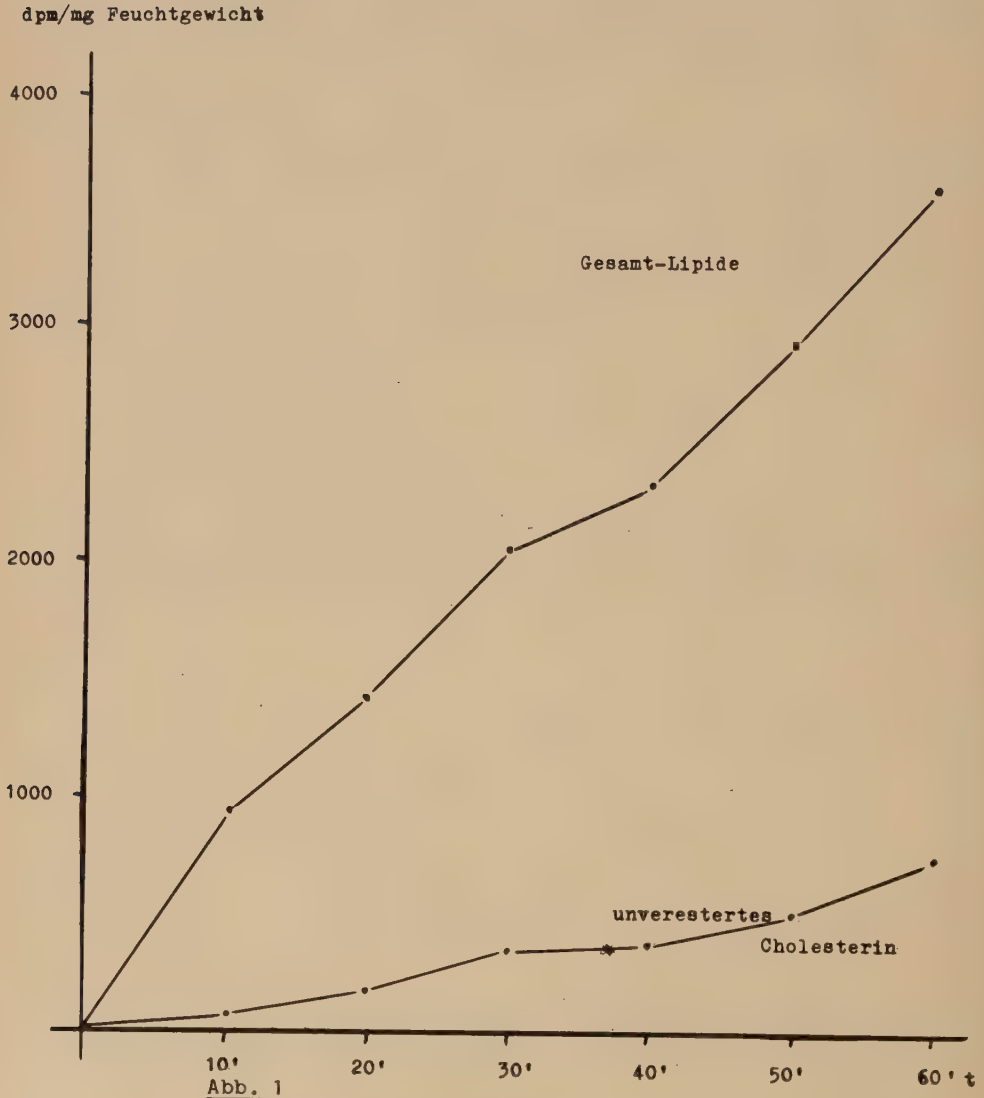
Tabelle 1 gibt noch einmal gekürzt und zusammengefaßt den Aufarbeitungsgang wieder:

1. Narkotisieren der Tiere, Herzpunktion und Herausnahme der Leber.
2. Herstellen der Leberschnitten.
3. Wiegen des feuchten Lebergewebes.
4. Inkubation mit

1,3	µC	14-C-L-Asparaginsäure (U)	(EK 5,75 mal 10^{-4} M)
1,3	µC	14-C-2-Na-azetat	(EK 1,0 mal 10^{-3} M)
1,3	µC	14-C-Glycin (U)	(EK 5,4 mal 10^{-4} M)
0,67	µC	14-C-7-Nikotinsäure	(EK 1,5 mal 10^{-5} M)
		Glukose	(EK 5 mal 10^{-3} M)
- in 2,0 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, pH 7,4,
Temp. 37 Grad Celsius, t 60 Minuten, Carbogen Atmosphäre,
5. Einfrieren und Auftauen.
6. Lipidextraktion mit Methanol/Chloroform.
7. Nukleotideextraktion mit Perchlorsäure bei 0 Grad Celsius.
8. Nukleinsäureextraktion mit Perchlorsäure bei 80 Grad Celsius.
9. Waschen und Trocknen des Proteinrestes.
10. Bestimmung der Serumwerte.

Tabelle 1:

In Abbildung 1 wird gezeigt, daß der Einbau von ^{14}C -Azetat in das unveresterte Cholesterin und in die Gesamt-Lipid-Fraktion zeitabhängig abläuft:



Einbau von ^{14}C -Azetat in die Gesamt-Lipid-Fraktion und in das unveresterte Cholesterin in Abhängigkeit zur Zeit.

Tabelle 2 zeigt an einem Kollektiv von jeweils acht Stichproben befriedigende Übereinstimmung von Doppelwerten sämtlicher gemessenen Synthesen:

Zeit	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
60'	8	107	476	676	161
60'	8	135	515	633	185

Tab. 2

Vergleich zweier zufällig ausgewählter Stichproben für die Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthesen. Inkubation und Aufarbeitung siehe Methodik.

Aus Tabelle 3 nach Grün (7) ist zu ersehen, daß die Protein-Synthese und die NAD-Synthese nur dann ablaufen, wenn der Energiestoffwechsel der inkubierten Rattenleberschnitten nicht gehemmt wird (Hemmung der Synthesen unter Einfluß von KCN, Jodazetat und Stickstoff). Aktinomycin D und Fluorazetat führen ebenfalls einer beträchtlichen Hemmung der Protein- und NAD-Synthese, während die Nukleinsäure-Synthese meist geringer beeinflusst wird.

Inkubations- bedingungen	Protein- Synthese	NAD- Synthese	Nukleinsäure- Synthese
	% der Kontrolle		
mit KCN	6	3	16
mit Jodazetat	6	3	34
mit Stickstoff	3	5	56
mit Aktinomycin D	13	9	62
mit Fluorazetat	42	43	86

Tab. 3

Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf die Protein-, NAD-, Nukleinsäure-Synthese.

In späteren Versuche, die nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, wurde deshalb ein anderes Extraktionsverfahren für die Nukleinsäuren gewählt.

Weitere methodische Versuche zeigen:

1. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Protein- und NAD-Synthese vom eingesetzten Feuchtgewicht des Lebergewebes (16,17).
2. Eine lineare Abhängigkeit der Protein- und NAD-Synthese besteht von der Inkubationszeit (16,17).
3. Protein und Nukleinsäure werden meßbar fast ausschließlich aus den eingesetzten Aminosäuren synthetisiert (16,17).
4. NAD wird meßbar praktisch nur aus der eingesetzten Nikotinsäure synthetisiert (16,17).
5. Alle Synthesen laufen nur ab, wenn Sauerstoff zugegen ist oder die Atmung und der Energiestoffwechsel intakt sind (7,16,17).

B Untersuchungen über den Einfluß von Bilirubin in vitro.

Da es im Verlauf der ANIT-Cholestase an der Ratte zu einer Erhöhung des Serumbilirubins (siehe auch Tab. 5,7,9) kommt und damit möglicherweise auch zu einer Bilirubinanhäufung in der Leber selbst, wurde der Einfluß von direkt den Inkubationsansätzen zugesetztem Bilirubin untersucht.

Wie Tabelle 4 zeigt, bleiben die Synthese-Leistungen der Leberschnitten bis zu einer Bilirubin-Konzentration von 20mg/100ml Inkubationsansatz unbeeinflußt.

Versuchs- bedingungen	n	Cholesterin- Synthese dpm/mg Feuchtgew.	% der Kontrolle	NAD- Synthese dpm/mg Feuchtgew.	% der Kontrolle	Protein- Synthese dpm/mg Feuchtgew.	% der Kontrolle	Nukleinsäure- Synthese dpm/mg Feuchtgew.	% der Kontrolle
Kontrolle	6	73 ± 23	-	781 ± 347	./.	548 ± 239	./.	207 ± 32	./.
0,05 mg Bilirubin pro ml Ansatz	6	84 ± 40	115	874 ± 462	113	541 ± 171	99	219 ± 171	106
0,2 mg Bilirubin pro ml Ansatz	6	115 ± 38	158	745 ± 425	96	338 ± 73	62	167 ± 77	81
0,5 mg Bilirubin pro ml Ansatz	6	38 ± 22	52	425 ± 294	54	277 ± 60	51	117 ± 31	57

Tab. 4

Einfluß steigender Bilirubin-Konzentrationen auf die Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese an Rattenleberschnitten in vitro.

Inkubationsansatz und Aufarbeitung siehe Methodik.

Erst bei der extrem hohen Konzentration von 50 mg Bilirubin pro 100 ml Inkubationsansatz kommt es zu einer deutlicher ausgeprägten Hemmung der Synthesen.

Da diese Bilirubin-Spiegel im Verlauf der ANIT-Cholestase zumindest im Serum nicht annähernd erreicht werden, darf wohl ein direkter Einfluß von Bilirubin auf die gemessenen Syntheseleistungen als unwahrscheinlich angenommen werden. Allerdings wurden die Bilirubinkonzentrationen in der Leber selbst nicht bestimmt.

Der Versuch, einen direkten Einfluß der beiden cholestaseerzeugenden Substanzen ANIT und Ikterogenin, über deren Wirkung in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, auf die gemessenen Synthesen auszuschließen, scheiterte an ihrer schlechten Löslichkeit, so daß sie in die Inkubationsansätze direkt nicht eingegeben werden konnten.

C Untersuchungen bei der ANIT-Cholestase

Wie Tabelle 5 zeigt, kommt es 24 Stunden nach oraler Applikation von ANIT bereits zu einer mäßig ausgeprägten Bilirubinerhöhung im Serum der so behandelten Ratten, wobei die signifikant erhöhten Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und Leucin-Amino-Peptidase eindeutig zeigen, daß hier ein Ikterus cholestatischen Ursprungs vorliegen muß:

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin mg %	SGPT mU/ml	AP mU/ml	SLAP mU/ml	Gesamt-Cholesterin mg %
Kontrolle	13	0,44 ± 0,14	23 ± 10,5	425 ± 135	17 ± 5	71 ± 11
24 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	7	1,7 ± 0,8	133 ± 99	849 ± 409	26 ± 7	117 ± 37
P	./.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05	> 0,1

Tab. 5

Leberfunktionsproben im Rattenserum 24 Stunden nach oraler ANIT-Applikation.

Auch der Serum-Cholesterin-Spiegel ist zu diesem Zeitpunkt bereits angedeutet erhöht. Die gleichfalls signifikant und deutlich erhöhten Werte für die SGPT weisen darauf hin, daß vermutlich auch Leberzellnekrosen durch ANIT-Applikation hervorgerufen worden sind.

Histologisch erkennt man bei der lichtmikroskopischen Untersuchung 24 Stunden nach ANIT-Applikation auffällige Veränderungen an den Gallengängen in den Periportalfeldern. Die Epithelien der Gallengänge sind zerstört, die Kerne aufgebläht (Abb.2), das Lumen erscheint verengt (Abb. 3). In der Umgebung der Gallengänge finden sich, zum Teil konzentrisch angeordnet, Rundzellen und gelapptkernige Leukozyten, darunter auch eosinophile Leukozyten (Abb.3). Weniger betroffen erscheinen die Übergangsstrukturen, die sogenannten Ductuli. Die Leberzellen sind diffus acidophil degeneriert, teilweise ballonisiert. Man sieht eine diffuse Reaktion der Kupffer'schen Sternzellen. Eine Ablagerung von Pigment oder Fett kann nirgends nachgewiesen werden. Die Kontrollpräparate zeigen normales Lebergewebe (Abb.4).

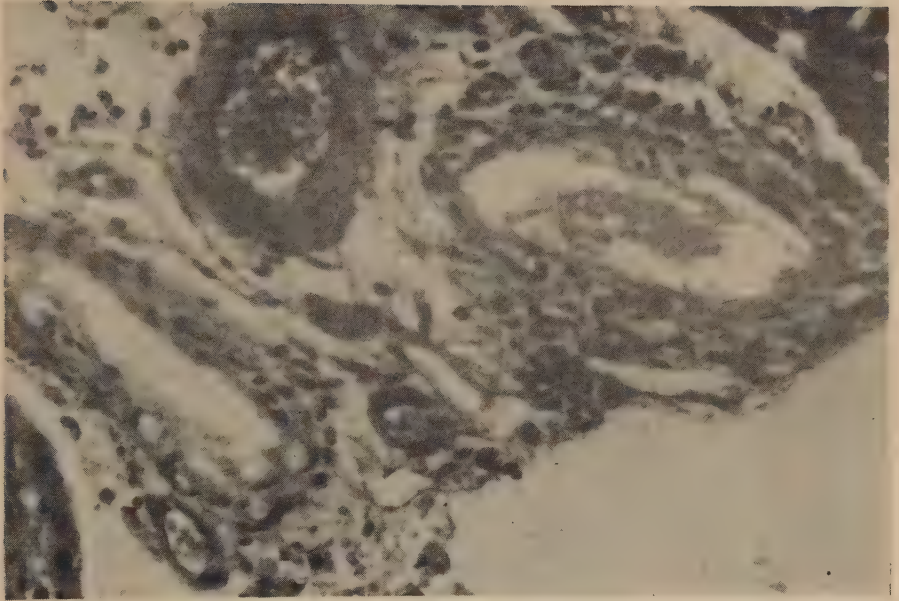


Abb. 2

Periportalfeld, links unten im Bild Gallengang mit zerstörtem Epithel. Mäßige Rundzellinfiltration im Periportalfeld. (24 Stdn. nach ANIT-Applikation).

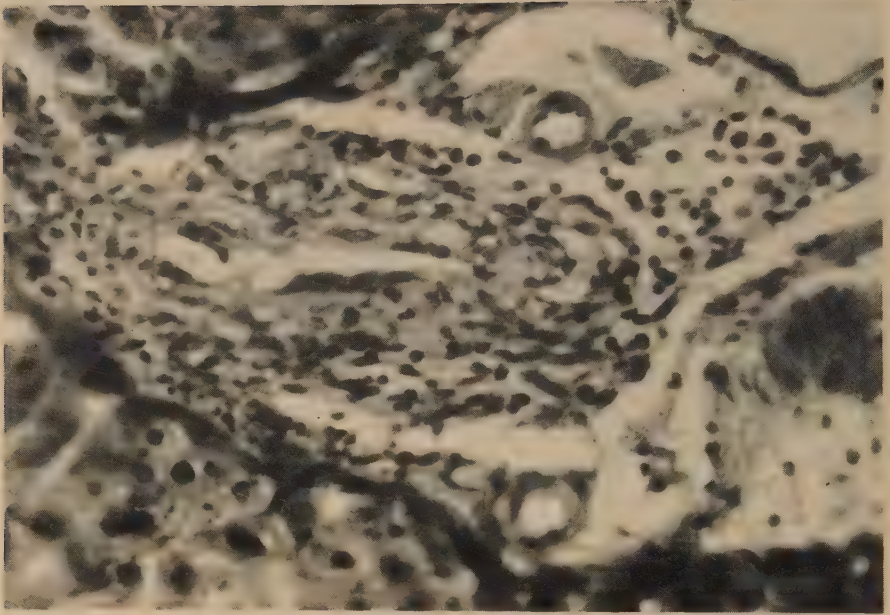


Abb. 3

Periportalfeld mit Gallengang. Zerstörtes Epithel,
Verengung der Lichtung, konzentrische Anordnung von
gelapptkernigen Leukozyten und Rundzellen.
(24 Stdn. nach ANIT-Applikation).

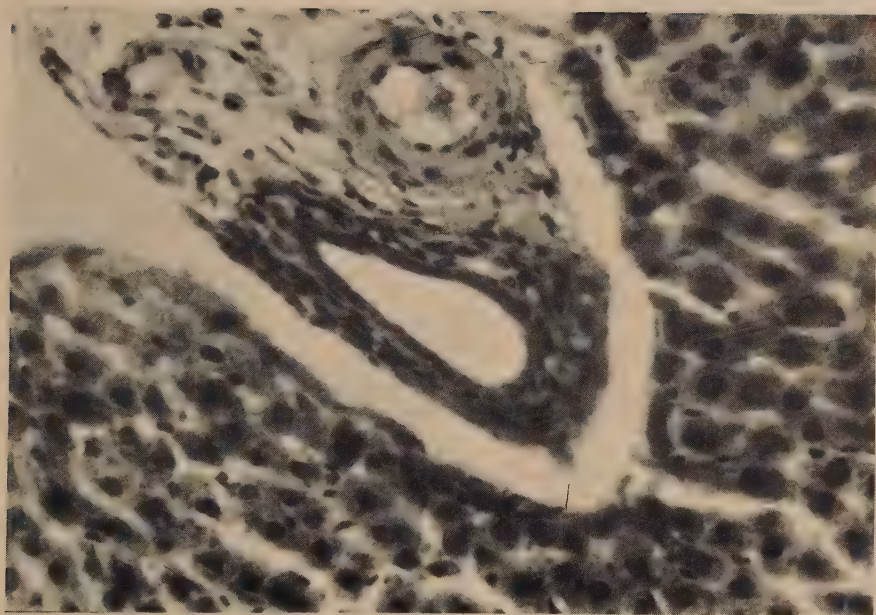


Abb. 4

Normales Periportalfeld (Kontrolle zu Versuch
24 Stdn. nach ANIT-Applikation).

Wie Tabelle 6 zeigt, laufen zu diesem frühen Zeitpunkt der ANIT-Cholestase sämtliche gemessenen Synthesen noch unverändert ab:

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	16	121 ± 65	495 ± 132	654 ± 155	173 ± 41
24 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	8	105 ± 96	420 ± 77	539 ± 204	241 ± 148
P	./.	> 0,4	> 0,075	> 0,075	> 0,15

Tab. 6

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberschnitten von Ratten 24 Stdn. nach oraler ANIT-Applikation in vitro im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

48 Stunden nach ANIT Intoxikation sind die Veränderungen im Serum der Versuchstiere wesentlich stärker ausgeprägt.

Wie Tabelle 7 zeigt, ist der Serum-Bilirubin-Spiegel auf 3,65 mg% weiter angestiegen, die für die Cholestase typischen Enzyme, alkalische Phosphatase und SLAP, sind weiterhin deutlich erhöht und der Cholesterin-Spiegel des Serums ist nunmehr auf etwa 240 mg% angestiegen:

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin mg %	SGPT mU/ml	AP mU/ml	SLAP mU/ml	Gesamt-Cholesterin mg %
Kontrolle	13	0,44 ± 0,14	23 ± 10,5	425 ± 135	17 ± 5	71 ± 11
48 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	6	3,65 ± 1,0	551 ± 297	1641 ± 342	42 ± 14	239 ± 99
P	./.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Tab. 7

Leberfunktionsproben im Rattenserum 48 Stdn. nach oraler ANIT-Applikation.

Zu diesem Zeitpunkt läßt sich auch, wie es für die Cholestase typisch ist, eine deutlich und signifikant erhöhte Cholesterin-Synthese in der Leber selbst nachweisen:

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	16	121 ± 65	495 ± 130	694 ± 155	173 ± 41
48 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	8	240 ± 128	579 ± 139	795 ± 292	208 ± 52
P	./.	< 0,01	> 0,1	> 0,075	> 0,05

Tab. 8

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberschnitten von Ratten 48 Stdn. nach oraler ANIT-Applikation in vitro im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Die anderen gemessenen Synthesen sind noch nicht signifikant erhöht.

Zu diesem Zeitpunkt finden sich etwa die gleichen Reaktionen an den Gallengängen (Abb.5) und im Leberparenchym (Abb.6) wie nach der oralen ANIT-Applikation nach 24 Stunden. Diesmal sind auch im stärkeren Maße die Ductuli betroffen (Abb.7), ihr Lumen erscheint verengt, die Kerne der Epithelien aufgebläht. Man sieht eine deutliche mesenchymale Reaktion in den Periportalfeldern aber nur wenig gelapptkernige Leukozyten. Die Kupffer'schen Sternzellen sind proliferiert. Die Leberzellen sind von wechselnder Größe, mit verschiedenen großen Kernen, zum Teil Doppelkernen. In diesen Präparaten findet sich ein größeres Nekrosefeld (Abb.6) mit entzündlichem Randwall und Fibrineinlagerung. Pigment- oder Fettablagerungen sind nicht erkennbar. Die Kontrollpräparate zeigten normales Lebergewebe (Abb.8).

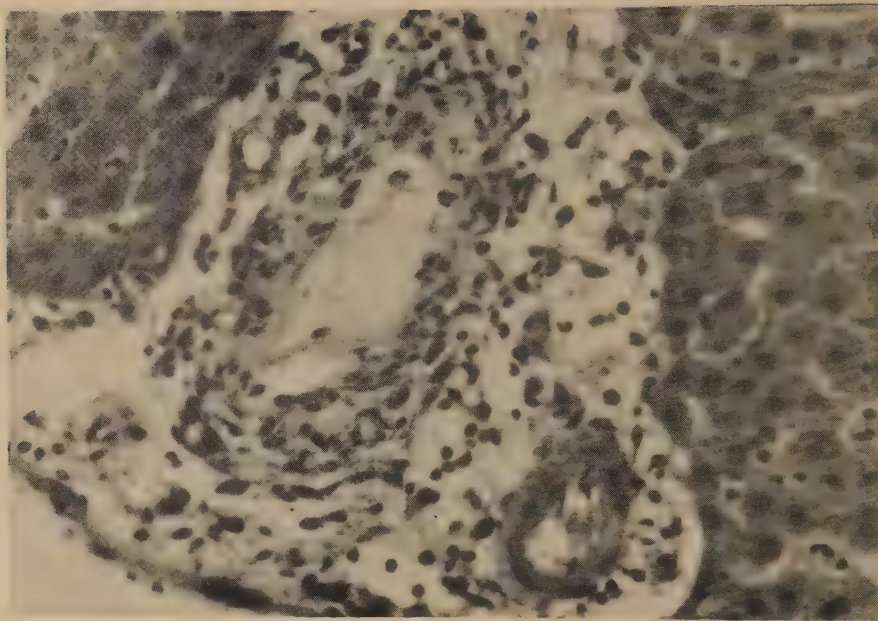


Abb. 5

Periportalfeld mit zerstörtem Gallengang und
entzündlicher Begleitreaktion.

(48 Stdn. nach ANIT-Applikation)



Abb. 6

Nekrosefeld im Leberparenchym mit entzündlicher
Begleitreaktion.

(48 Stdn. nach ANIT-Applikation).

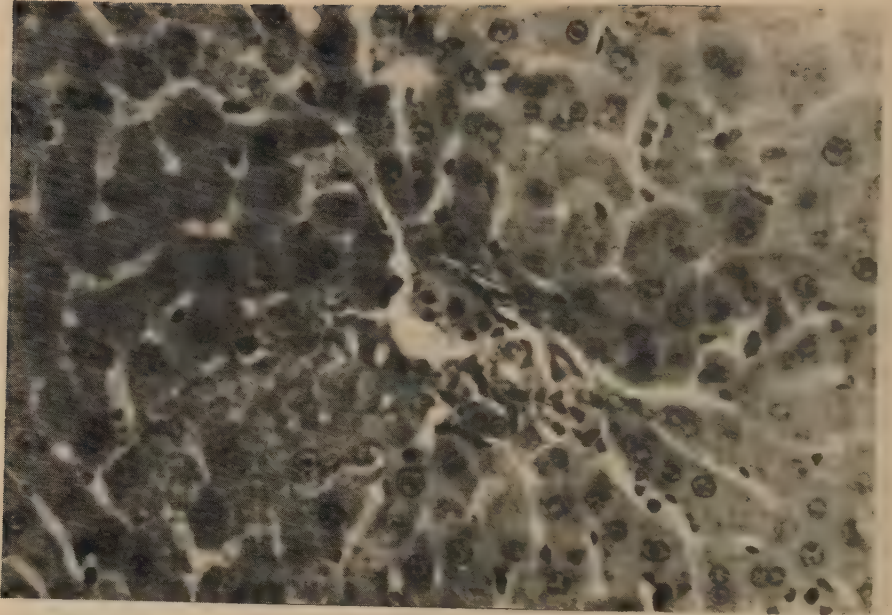


Abb. 7

Ductulus mit aufgeblähten Epithelzellen.
(48 Stdn. nach ANIT-Applikation).

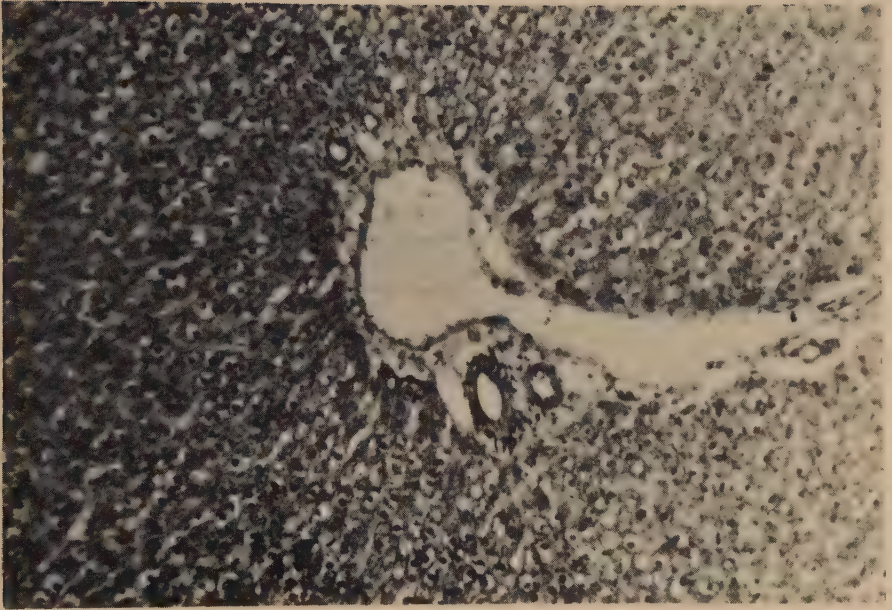


Abb. 8

Normales Periportalfeld (Kontrolle zu Versuch
48 Stdn. nach ANIT-Applikation).

72 Stunden nach ANIT-Intoxikation finden sich im Rattenserum Veränderungen, die dem Vollbild der ANIT-Cholestase entsprechen, wie es bereits in der Literatur (2,5,12,13,14,22,23) beschrieben worden ist. Der Serum-Bilirubin-Spiegel hat sich auf 7,3 mg% weiter deutlich erhöht, alkalische Phosphatase, SLAP und Gesamt-Cholesterin sind unverändert hoch, während die SGPT bereits wieder abzufallen scheint.

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin mg %	SGPT mU/ml	AP mU/ml	SLAP mU/ml	Gesamt-Cholesterin mg %
Kontrolle	13	0,44 ± 0,14	23 ± 10,5	425 ± 135	17 ± 5	71 ± 11
72 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	6	7,3 ± 3,6	343 ± 97	1510 ± 111	55,5 ± 35	266 ± 95
P	./.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Tab. 9

Leberfunktionsproben im Rattenserum 72 Stdn.
nach oraler ANIT-Applikation.

Wie Tabelle 10 zeigt, ist die für die Cholestase besonders typische Erhöhung der Cholesterin-Synthese noch stärker ausgeprägt, zusätzlich läßt sich nunmehr aber auch eine deutliche und signifikante Steigerung der Nukleinsäure- und Protein-Synthese nachweisen:

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	16	121 ± 65	495 ± 132	654 ± 155	173 ± 41
72 Stunden nach 100 mg/kg ANIT	6	396 ± 250	647 ± 93	1362 ± 418	299 ± 75
P	./.	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Tab. 10

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberschnitten von Ratten 72 Stdn. nach oraler ANIT-Applikation in vitro im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Die als Kontroll-Synthese vorgesehene NAD-Synthese ist zwar auch signifikant, aber bei weitem nicht so ausgeprägt erhöht.

In den histologischen Präparaten zeigen die Veränderungen 72 Stunden nach oraler ANIT-Applikation an den Gallengängen rückläufige Tendenz. Man erkennt an einigen Gallengängen schon wieder ein normales Epithel, nur noch wenige Zellkerne erscheinen vergrößert (Abb.9). Die entzündliche Reaktion ist noch deutlich ausgeprägt, besonders eosinophile Leukozyten treten auf (Abb.10). Im Parenchym sind als Ausdruck regenerierender Vorgänge gehäuft Mitosen anzutreffen (Abb.11), es besteht auch noch eine Unruhe der Zellkerne und Größenunterschiede der Leberzellen (Abb.11). Wiederum kein Nachweis von Pigment oder Fett in Leber- oder Sternzellen.

Die Kontrollpräparate zeigen normales Lebergewebe (Abb.8)

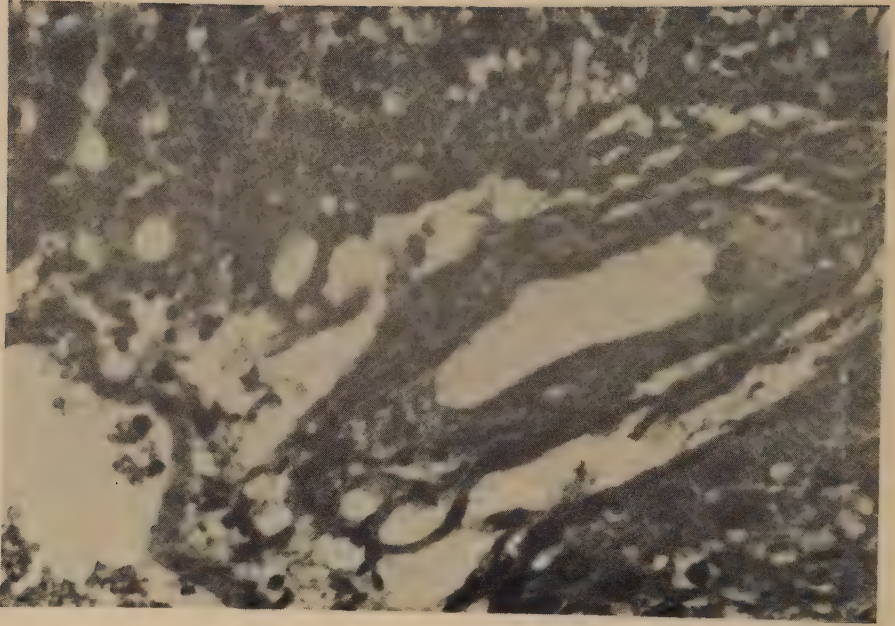


Abb. 9

Periportalfeld mit Gallengang. Bereits wieder aufgebautes Epithel, einzelne geblähte Epithelzellen.

(72 Stdn. nach ANIT-Applikation).

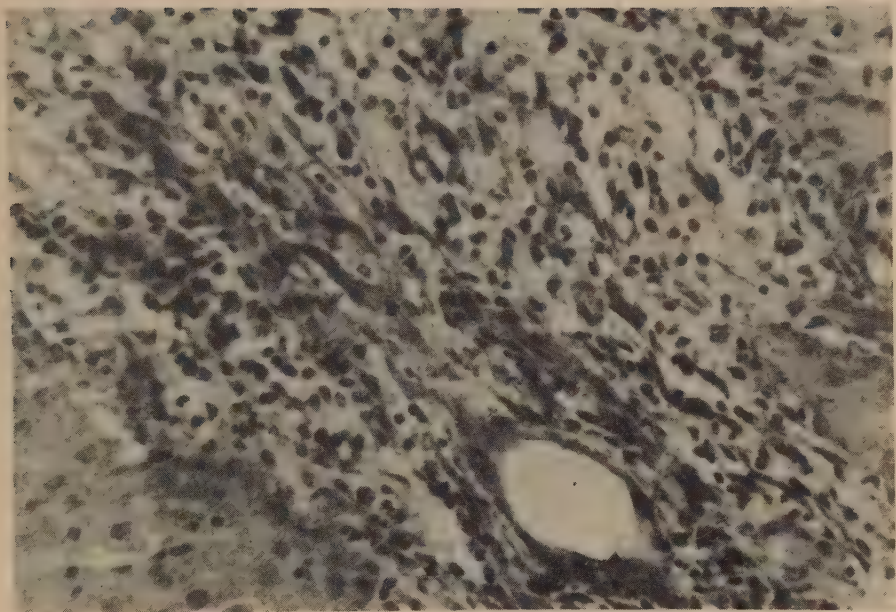


Abb. 10

Periportalfeld mit längsgeschnittenem Gallengang.

Erheblich entzündliche Reaktion.

(72 Stdn. nach ANIT-Applikation)

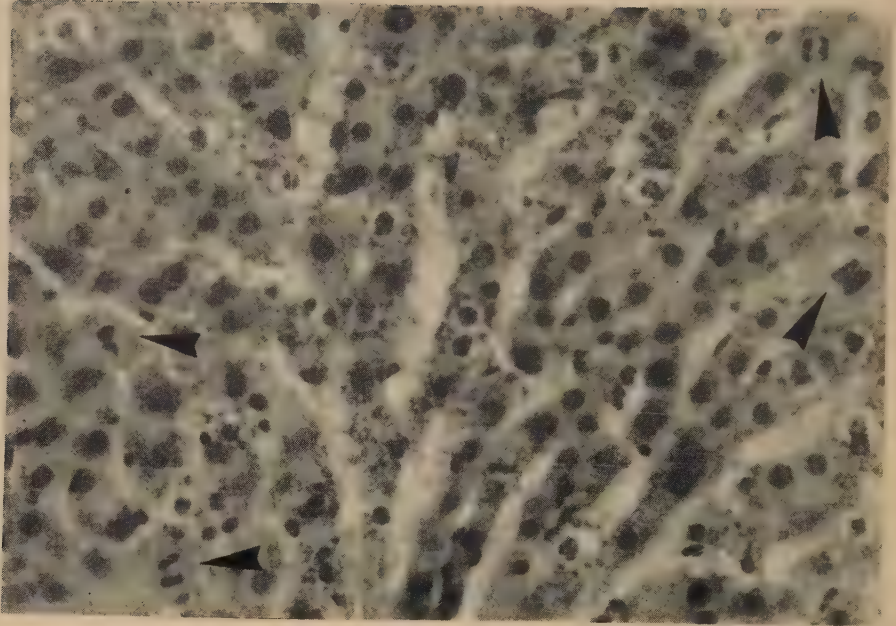


Abb. 11

Leberparenchym mit vielen Mitosen (→) in den Leberzellen, deutliche Größenunterschiede der Leberzellen und Zellkerne.

(72 Stdn. nach ANIT-Applikation).

D Untersuchungen bei der IKTEROGENIN-Intoxikation

Wie die Tabellen 11 und 12 zeigen, kommt es bei der vorwiegend intrahepatischen Cholestase nach einmaliger Ikterogenin-Applikation innerhalb von 24 und 48 Stunden nicht zu einem Ikterus, desgleichen bleiben sowohl die für die Cholestase typischen Enzyme SLAP und alkalische Phosphatase, wie auch die Transaminase unverändert. Auch der Serum-Cholesterin-Spiegel ist nicht erhöht:

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin mg %	SGPT mU/ml	AP mU/ml	SLAP mU/ml	Gesamt-Cholesterin mg %
Kontrolle	13	0,44 ± 0,14	23 ± 10,5	425 ± 150	17 ± 5	71 ± 11
24 Stunden nach 100 mg/kg Ikterogenin	9	0,49 ± 0,12	29 ± 17	414 ± 176	12,3 ± 4	58 ± 19

Tab. 11

Leberfunktionsproben im Rattenserum 24 Stdn nach intraperitonealer Ikterogenin-Applikation.

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin mg %	SGPT mU/ml	AP mU/ml	SLAP mU/ml	Gesamt-Cholesterin mg %
Kontrolle	13	0,44 ± 0,14	23 ± 10,5	425 ± 150	17 ± 5	71 ± 11
48 Stunden nach 100 mg/kg Ikterogenin	8	0,5 ± 0,2	22 ± 10	367 ± 173	14 ± 3	73 ± 13

Tab. 12

Leberfunktionsproben im Rattenserum 48 Stdn. nach intraperitonealer Ikterogenin-Applikation.

Ähnlich wie bei der ANIT-Cholestase läßt sich aber auch in den Versuchen mit Ikterogenin 24 Stunden nach Verabreichung eine deutliche und signifikante Steigerung aller gemessenen Synthesen nachweisen (Tab. 13). Sie läßt sich aber bereits 48 Stunden nach einmaliger Verabreichung von Ikterogenin nicht mehr nachweisen (Tab. 14).

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	4	52 ± 1,25	603 ± 74	243 ± 31	104 ± 12
24 Stunden nach 100 mg/kg Ikterogenin	10	163 ± 104	1067 ± 412	602 ± 175	241 ± 59
P	./.	< 0,05	< 0,05	< 0,015	< 0,025

Tab. 13

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberschnitten von Ratten, 24 Stdn. nach intraperitonealer Ikterogenin-Applikation in vitro, im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nukleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	16	121 ± 65	495 ± 132	654 ± 155	173 ± 41
48 Stunden nach 100 mg/kg Ikterogenin	10	151 ± 23	495 ± 93	706 ± 78	198 ± 22
P	./.	> 0,1	-	> 0,2	< 0,05

Tab. 14

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberschnitten von Ratten, 48 Stdn. nach intraperitonealer Ikterogenin-Applikation in vitro, im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Untersuchungen, ob nach mehrmaliger und höher dosierter Gabe von Ikterogenin diese Veränderungen verstärkt und länger anhaltend nachzuweisen gewesen wären, mußten unterbleiben, da nicht genügend Substanz zur Verfügung stand.

Histologisch finden sich 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von Ikterogenin keine kennzeichnenden Veränderungen.

Im Zentralläppchengebiet sieht man einige ballonisierte Zellen (Abb.12), die Periportalfelder sind normal (Abb.13). Die Gallengänge sind normal aufgebaut. Fett- oder Pigmentablagerungen sind nicht nachzuweisen. Im Vergleich zu den Kontrollpräparaten fällt lediglich auf, daß bei den Kontrollen die Leberzellen insgesamt ruhiger erscheinen, d.h. der Wechsel von verschiedenen Größen der Zellen und Kerne ist nicht so deutlich ausgeprägt (Abb. 14).

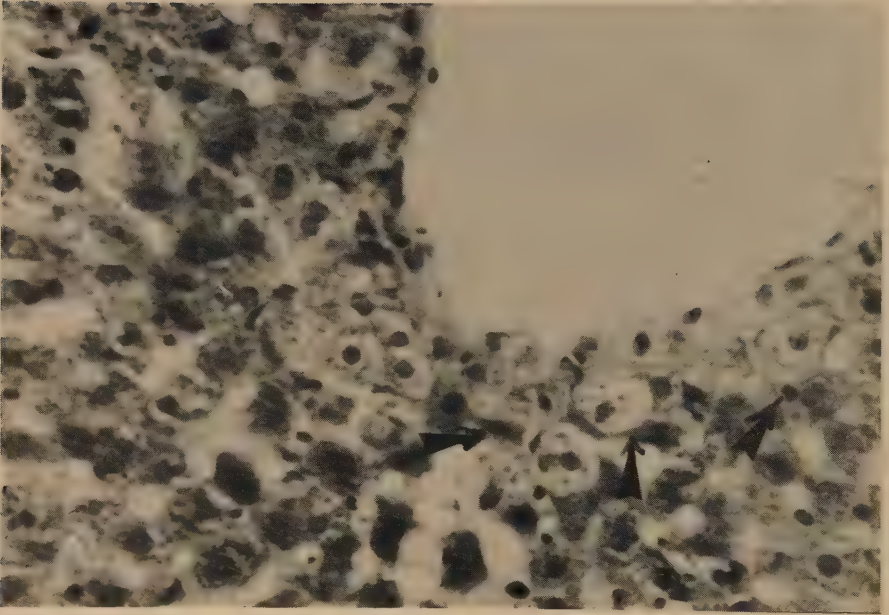


Abb. 12

Zentralfeld mit einigen ballonisierten Zellen
(→).

(Intraperitoneale Ikterogenin-Applikation).

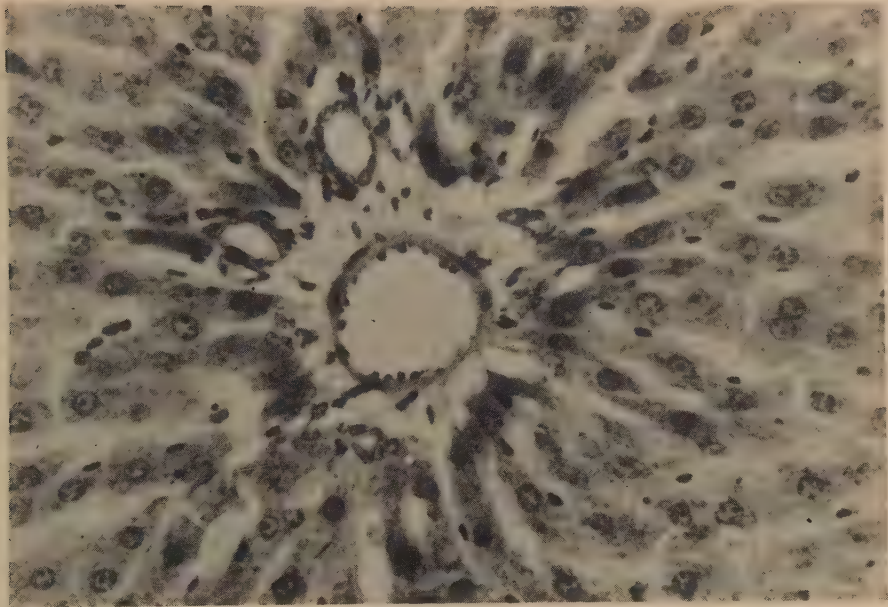


Abb. 13

Normales Periportalfeld (nach intraperitonealer
Ikterogenin-Applikation).

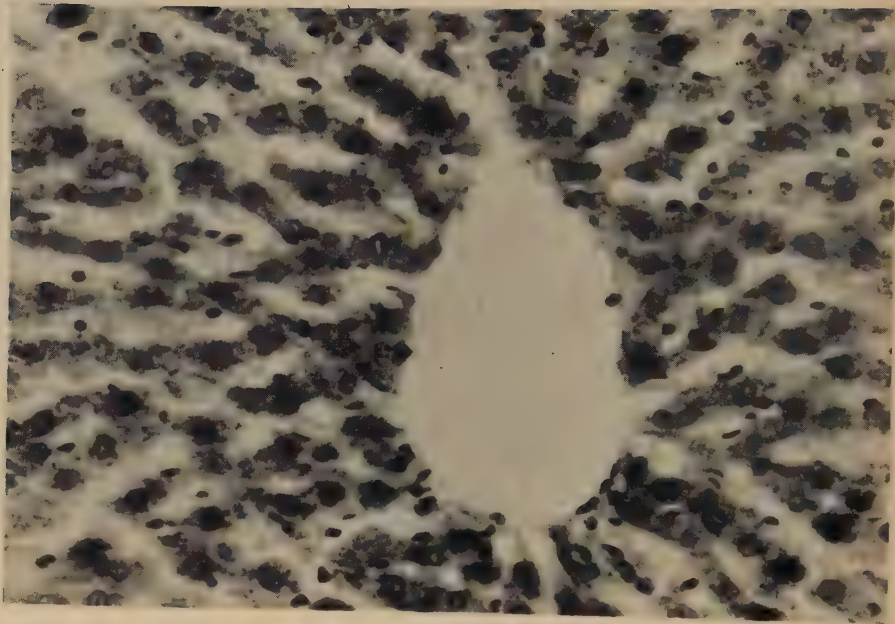


Abb. 14

Normales Zentralfeld (Kontrolle zu Ikterogenin-Applikation).

V. DISKUSSION

Der Diskussion soll eine kurze Zusammenfassung der erhobenen Befunde vorausgehen:

Wie bereits bekannt, führt in den aufgeführten Versuchen die Verfütterung von ANIT zu einer nekrotisierenden Cholangitis mit Leberzellnekrosen und einem Ikterus vom cholestatischen Typ (2,5,12,13, 14,18,21,22,23). Auf dem Höhepunkt der Erkrankung lassen sich die typischen Veränderungen im Serum nachweisen, gleichzeitig findet sich in der Leber selbst eine deutlich erhöhte Synthese für Protein, Nukleinsäuren, Cholesterin und NAD.

Die intraperitoneale Applikation von Ikterogenin (6) - einem Alkaloid aus der *Lippia Rhemannii*, von dem bekannt ist, daß es bei Schafen einen Ikterus vom cholestatischen Typ hervorrufen kann - führt in der in unseren Versuchen angewandten Dosierung, zu keinerlei meßbaren Veränderungen im Serum; dennoch lassen sich in der Leber von Ratten nach Gabe von Ikterogenin gesteigerte Syntheseraten für Protein, Nukleinsäuren, NAD und Cholesterin nachweisen.

Ergänzende Versuche haben gezeigt, daß diese Veränderungen in der Rattenleber kaum durch eine eventuelle Bilirubinerhöhung bedingt sein können.

Diese Befunde sollen in zweifacher Hinsicht diskutiert werden:

1. Ein Hauptsymptom cholestatischer Lebererkrankungen beim Menschen ist, neben der Erhöhung des Serum-Bilirubins und der Serum-Enzyme SLAP und AP, ein deutlich erhöhter Serum-Cholesterin-Spiegel, wie er sich auch in unseren Versuchen bei der ANIT-Cholestase an der Ratte zeigen läßt.

Diese Erhöhung des Serum-Cholesterins bei cholestatischen Lebererkrankungen ist nach Arbeiten von Byers et al., Fredrickson et al. und Friedmann et al. (1,3,4) und nach den Untersuchungen von Kattermann und Creutzfeldt (10) auf eine erhöhte Cholesterin-Synthese in der Leber zurückgeführt worden.

Unsere Untersuchungen zeigen sowohl bei der Tauroolithocholsäure (19), als auch bei der Ikterogenin- und bei der ANIT-Cholestase eine deutlich erhöhte Cholesterin-Synthese in der Leber. Das Ausmaß der Erhöhung der Cholesterin-Synthese weicht bei allen drei Erkrankungen nicht wesentlich voneinander ab. Dennoch kommt es nur bei der

ANIT-Cholestase in unseren Untersuchungen und beim akuten experimentellen Gallengangsverschluß (3) zu einer signifikanten Erhöhung des Serum-Cholesterins. Unseres Erachtens muß, da es sich bei der ANIT-Cholestase um einen Verschlußikterus, - wie beim experimentellen Gallengangsverschluß - vorwiegend vom Typ der extrahepatischen Cholestase handelt, der mechanischen Abflußbehinderung der Galle für die Erhöhung des Serum-Cholesterin-Spiegels eine besondere Bedeutung zukommen. Dies um so mehr, als sich auch bei Lebererkrankungen beim Menschen, die im allgemeinen nicht mit einem erhöhten Serum-Cholesterin-Spiegel einhergehen, deutlich erhöhte Cholesterin-Synthese-Raten in Leberpunktaten in vitro messen lassen (16,17).

2. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde einer deutlich erhöhten Protein-Synthese bei der experimentellen Cholestase der Ratte zeigen, daß eine erhöhte Protein-Synthese nicht nur bei der akuten Hepatitis am Menschen nachweisbar ist, sondern daß auch eine ätiologisch ganz verschiedene Lebererkrankung zu einer erhöhten Protein-Synthese in der Leber führen kann. Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war, wie bereits in der Einleitung ausgeführt, die Beobachtung einer deutlich erhöhten Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberpunktionszylindern von Patienten mit akuter Virus-Hepatitis. Es ist somit offensichtlich, daß eine erhöhte Protein- und Nukleinsäure-Synthese in Leberpunktaten nicht spezifisch auf einen Virusinfekt zurückzuführen ist. Wie sich aus diesen und aus anderen Untersuchungen (16,17) ergibt, kommt es auch nicht zu einer spezifischen Erhöhung der Protein-Synthese allein, sondern andere Synthesen sind, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß, ebenfalls deutlich erhöht.

Es wird also durch die vorliegenden Untersuchungen die Beobachtung gestützt, daß bei Lebererkrankungen ganz unterschiedlicher Genese (akute Hepatitis, floride chronische Hepatitis, Leberzirrhose, intra- und extrahepatische Cholestase am Menschen, intra- und extrahepatische Cholestase an der Ratte), als weitgehend gleichförmige Reaktion der Leber, sich in vitro erhöhte Synthese-Raten für Protein, Nukleinsäuren, Cholesterin und NAD messen lassen (16,17). Aufgrund der bislang bekannten Tatsachen (16,16) und der vorliegenden Untersuchungsergebnisse läßt sich nicht entscheiden, ob nur die Leber-epithelien oder vorwiegend die mesenchymalen Zellbestandteile der Leber für diese erhöhten Synthese-Raten verantwortlich sind. Die

Vergiftungsversuche sprechen aber sehr dafür, daß es die Leberparenchymzellen sind.

Der etwas überraschende Befund, daß sich bei Erkrankungen der Leber erhöhte Synthese-Raten für Protein, Nukleinsäuren, Cholesterin und NAD finden, steht zumindest bezüglich der Protein-Synthese in einem gewissen Gegensatz zu klinischen Befunden. Um nur zwei Beispiele zu erwähnen, kommt es bei der akuten Hepatitis zu einem Absinken der in der Leber gebildeten Gerinnungsfaktoren des Prothrombinkomplexes, wie auch zu einem Absinken der in der Leber gebildeten Pseudocholinesterase. Die Hypalbuminaemie bei der Leberzirrhose ist ein seit langem bekanntes Symptom für diese Erkrankung, sie muß, nach neueren Untersuchungen (9), auf eine verminderte Albuminbildung in der Leber zurückgeführt werden.

Die Beantwortung der Frage, wie weit hier echte Gegensätze vorliegen, muß weiteren experimentellen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Desgleichen können im Rahmen dieser Arbeit nicht sämtliche theoretischen Möglichkeiten diskutiert werden. Immerhin ließ sich in Untersuchungen von Majumdar et al. (11) zeigen, daß eine in vitro gemessene erhöhte Protein-Synthese, die allerdings als Reaktion der Leber auf partielle Hepatektomie und akuten Stress auftrat, einer in vitro gemessenen erhöhten Albumin- und Fibrinogen-Synthese entsprach. Weiterhin finden sich bei der chronischen Hepatitis erhöhte Fibrinogenwerte im Serum der Patienten und vorläufige Untersuchungen (7) scheinen zu ergeben, daß sich bei der ANIT-Cholestase der Ratte ebenfalls ein erhöhter Serum-Fibrinogen-Spiegel messen läßt. Bezüglich der erhöhten Protein- und Nukleinsäure-Synthesen lassen sich, wie bereits oben zitiert, ganz ähnliche Synthesesteigerungen in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie und nach akutem Stress nachweisen. Da sich in unseren Untersuchungen, zumindest bei der ANIT-Cholestase, Leberzellnekrosen finden, muß diskutiert werden, ob die gemessene Erhöhung der Synthesen in der Leber Ausdruck von Regenerationsvorgängen ist. Überlegung ist jedoch weniger wahrscheinlich, da bei der intrahepatischen Cholestase nach Tauroolithocholsäure (19) deutlich erhöhte Synthese-Raten gemessen werden, obwohl lichtmikroskopisch keine sichtbaren Veränderungen in der Leber zu finden sind. Das wird auch durch Befunde bestätigt, die an der Rattenleber nach Luminal-Einfluß gefunden worden sind (15). Popper fand nach langdauernder Luminal-Applikation eine deutlich erhöhte Protein-Synthese (15), wobei sich lediglich elektronenoptisch

eine Zellschädigung im Bereich des endoplasmatischen Retikulums nachweisen ließ aber keine Leberzellnekrosen. Es könnte also sein, daß durch ganz verschiedene Noxen (akute Hepatitis, chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Cholestase, Drogeneinfluß) ein Schädigungsstoffwechsel der Leberzellen angestoßen wird, der sich in erhöhten Synthese-Raten äußert. Es ist kürzlich von Popper gefordert worden (15), daß es eine anabole ("anabolic or anticatabolic liver disease") Lebererkrankung geben muß, deren eine Ursache die Cholestase sein könnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob sich eine erhöhte Protein-Synthese in der durch Intoxikation oder mechanisch bedingten Verschlußikterus veränderten Rattenleber findet.

Eine vorwiegend intrahepatische Cholestase wurde durch intraperitoneale Applikation von Ikterogenin und eine Cholestase vom extrahepatischen Typ durch Verfütterung von ANIT erzeugt. Außerdem wurde der Einfluß von direkt den Inkubationsansätzen zugesetztem Bilirubin auf die Leberschnitten untersucht. Die Protein-Synthese, sowie die Synthese-Raten von NAD, Cholesterin und Nukleinsäure wurden durch Einbau von ^{14}C -markierten Substanzen in die entsprechenden Zellfraktionen gemessen.

Im Serum wurden Gesamt-Bilirubin, AP, SGPT, SLAP und Gesamt-Cholesterin photometrisch bestimmt.

Ergebnisse:

1. Die Untersuchungen über den Einfluß von Bilirubin in vitro zeigen, daß es erst bei einer Konzentration von 50 mg Bilirubin pro 100 ml Inkubationsansatz zu einer Hemmung der gemessenen Synthesen kommt.

2. Bei den Untersuchungen der ANIT-Cholestase kommt es 24 Stunden nach Verfütterung von ANIT zu einer geringgradigen Erhöhung von Bilirubin und Cholesterin im Serum, die Enzymaktivitäten sind signifikant erhöht. Die gemessenen Synthesen laufen unverändert ab. 48 Stunden nach ANIT-Intoxikation sind die Veränderungen im Ratten-serum wesentlich stärker ausgeprägt. Die Cholesterin-Synthese ist signifikant erhöht, die anderen gemessenen Synthesen sind noch nicht signifikant erhöht.

72 Stunden nach ANIT-Applikation hat sich der Serum-Bilirubin-Spiegel weiter erhöht, AP, SLAP und Gesamt-Cholesterin sind unverändert, die SGPT scheint bereits wieder abzufallen. Die gemessenen Synthesen sind alle signifikant erhöht.

3. Die Untersuchungen bei der Ikterogenin-Intoxikation zeigen innerhalb von 24 Stunden und 48 Stunden keine Veränderungen der untersuchten Serumwerte. Eine deutliche und signifikante Steigerung aller gemessenen Synthesen zeigt sich 24 Stunden nach Ikterogenin-Applikation, die sich aber 48 Stunden nach Verabreichung von Ikterogenin nicht mehr nachweisen läßt.

Die Ergebnisse werden d i s k u t i e r t.

VII. LITERATUR

- 1.) Byers, S. O., Friedmann, M., Michaelis, F.:
Observations concerning the production and excretion of
cholesterol in mammals.
J.biol.Chem. 188,637 (1951)
- 2.) Eliakim, M., Eisner, M., Ungar, H.:
Experimental intrahepatic obstruction jaundice following
injection of alpha-naphthyl-iso-thiocyanate.
Bull.Res.Council Israel 8 E: 17, (1959)
- 3.) Fredrickson, D. S., Loud, A. V., Hinkelmann, B. T.,
Schneider, H. S., Frantz, I. D.:
The effect of ligation of the common bile duct on cholesterol
synthesis in the rats.
J.exp.Med. 99,43 (1954)
- 4.) Friedmann, M., Byers, S. D.:
Observations concerning the production and excretion of
cholesterol in mammals.
J.clin.Invest. 34,1369 (1955)
- 5.) Goldfarb, S., Singer, E. J., Popper, H.:
Experimental cholangitis due to alpha-naphthyl-iso-thiocy-
anate (ANIT).
Amer.J.Path. 40, 685-698 (1962)
- 6.) Goldfischer, S., Arias, I. M., Essner, E., Novikoff, A. B.:
Cytochemical and Electron Microscopic Studies of the Rat
Liver with reduced Capacity to Transport Conjugates Biliru-
bin.
J.exp.Med. 115, 467-75 (1962)
- 7.) Grün, M.:
Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Justus
Liebig-Universität Giessen in Vorbereitung.
- 8.) Hamao Ijichi, Arata Ichiyama, Osamu Hayaischi:
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine
Dinucleotide.
J.biol.Chem. 241, 3701-3707 (1966)
- 9.) Jones, E. A., Craigie, A., Smallwood, R. A., Finkelstein, L.,
Rosener, V. M.:
The application of pool kinetics to the estimation of the
synthesis rate of liver produces plasma proteins.
V. International Meeting of the International Association
for the Study of the Liver.
Karlsbad 1968
- 10.) Kattermann, R., Creutzfeldt, W.:
Lipid Synthesis in rat liver in experimental cholestasis.
V. International Meeting of the International Association
for the Study of the Liver.
Karlsbad 1968

- 11.) Majumdar, C., Tsukada, K., Liebermann, I.:
Liver Protein Synthesis after Partial Hepatectomy and Acute Stress.
J.biol.Chem. 242, 700 (1967)
- 12.) Moran, E., Eliakim, M., Suchowolski, A., Ungar, H.:
Serum Vitamin B₁₂ and Glutamic oxalacetic Transaminase in experimental Intrahepatic Obstructive Jaundice.
Gastroenterology 40, 408 (1961)
- 13.) Moran, E., Ungar, H.:
The effect of intermittend administration of alpha-naphthyl-iso-thiocyanate to rats.
Amer.J.Path. 44, 947-960 (1964)
- 14.) Plaa, G. L., Rogers, L. A., Fonts, I. R.:
Effect of acute alpha-naphthyl-iso-thiocyanate administration on hepatic microsomal drug metabolism in the mouse.
Pro.Soc.Exp.Biol.Med. 119, 1045-1048 (1965)
- 15.) Popper, H.:
Panel discussion on drug injury.
V. International Meeting of the International Association for the Study of the Liver.
Prag 1968
- 16.) Richter, E.:
Messung verschiedener Syntheseleistungen der menschlichen Leber in Leberpunktaten.
8. Internationaler Kongress für Gastroenterologie.
Prag 1968
- 17.) Richter, E., Clauditz, S., Leinweber, B., Kühn, H. A.:
Erhöhte Protein-Synthese in Leberpunktaten von Patienten mit akuter Hepatitis.
Acta hepato-splen. 15, 376 (1968)
- 18.) Roberts, R. J., Pharm, B., Plaa, G. L.:
The effect of bile duct ligation, bile duct canunlation and hypothermia on alpha-naphthyl-iso-thiocyanate induced hyperbilirubinemia and cholestasis in rats.
Gastroenterology 50, 768 (1966)
- 19.) Schneider, M.:
Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Giessen in Vorbereitung.
- 20.) Sperry, W. M., Webb, M.:
A revision of the Schoenheimer-Webb method for Cholestrol determination.
J.biol.Chem. 187, 97 (1950)
- 21.) Steffenelli, N., Holzner, J. H.:
Experimentelle Cholestase der Ratte durch einmalige Gabe von alpha-naphthyl-iso-thiocyanat. Histologisch und enzymhistochemisch erfaßbare Veränderungen der Leber.
Z.ges.exp.Med. 139, 762 (1965)

- 22.) Steiner, J. W., Phillips, M. J., Baglio, C. M.:
Electron microscopy of the secretory pathways in the Liver
in ANIT-intoxication.
Amer.J.Path. 43, 677-696 (1963)
- 23.) Ungar, H., Moran, E., Eisner, M., Eliakim, M.:
Rat intrahepatic biliary tract lesions from alpha-naphthyl-
iso-thiocyanate.
Arch.Path. 73, 427 (1962)
- 24.) Winer, Alfred D.:
Crystallisation of Nicotiamide Adenine Dinucleotide.
J.biol.Chem. 239, 3598 (1964)

Herr Prof. Dr. med. H. A. Kühn, Direktor
an den Medizinischen Kliniken und Poli-
kliniken der Justus Liebig-Universität
Gießen, hatte die Freundlichkeit, mir das
Thema zu dieser Arbeit zu stellen.
Ich danke ihm dafür.

Für seine freundliche Unterstützung bei
der vorliegenden Arbeit möchte ich mich
auch bei Herrn Dr. med. E. Richter be-
danken.

Lebenslauf

Am 13. November 1934 wurde ich als Sohn des Julius Winter und seiner Ehefrau Emma in Neuohlsch /CSSR, geboren.

Meiner Schulpflicht kam ich in Neuohlsch, Tetschen und Rossleben an der Unstrut nach, wo ich auch 1953 die Reifeprüfung ablegte.

Das Medizinstudium begann ich dann 1953 an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig und bestand dort 1955 das Physikum. Nach der Übersiedlung nach Frankfurt am Main studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt noch 4 klinische Semester, danach mußte ich das Studium aus wirtschaftlichen Gründen unterbrechen.

Zum Sommer-Semester 1967 nahm ich mein Medizinstudium an der Justus Liebig-Universität Gießen wieder auf und legte dort das Staatsexamen ab.

